

明 細 書

赤血球機能修飾物質

5 技術分野

本発明は、赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態又は R-状態に安定化する物質を含む、赤血球からの ATP 遊離調節剤、並びに前記物質を含む医薬組成物に関する。

10 背景技術

疾患の治療及び臨床検査の場において、薬物を効果的かつ選択的に標的組織に送達させるために、特定の組織への薬物送達の方法、すなわちドラッグデリバリーシステムの開発が望まれている。ドラッグデリバリーシステムを確立させるための重要な要素の1つは、薬物の運搬体である。これまでに、薬物の運搬体として機能する物質については多数の研究がなされており、中でも赤血球を運搬体として使用するための技術が開発されている（特表 2003-522140 号公報、特表 2001-512480 号公報）。上記公報には、赤血球がその内部又は表面に薬物又は酸素を結合し、運搬するための担体として機能していることが記載されている。

しかしながら、赤血球は、標的組織への薬物や酸素の運搬体としてのみ認識されており、赤血球自身が有する生理機能を人為的に制御してこれを臨床に応用する技術は知られておらず、赤血球の有する酸素放出能や血管拡張作用を、標的部位において特異的に発揮させる方法は見出されていなかった。

一方、赤血球に、血中酸素分圧の低下、pH の低下、又は機械的変形などのさまざまな刺激を与えると ATP を遊離することが知られている（Sprague, R. S. et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol., 281 : C1158-C1164, 2001）。そして、赤血球から遊離した ATP は、内皮細胞上の特異的受容体に作用し、一酸化窒素(NO)とプロスタサイクリンの血管内皮での合成と遊離を促進する。この両者は、血管拡張反応に深く関与することが知られている。

しかしながら、赤血球からの ATP 遊離の詳細な分子機構とその酸素濃度依存性の詳細は明らかではなく、そのため ATP の遊離現象を具体的にどのように病態の制御に応用すればよいかは依然として不明確であった。

5 発明の開示

ATP を遊離する赤血球、ATP を遊離させる薬物を含む赤血球、及び ATP を遊離する赤血球を含む医薬組成物を提供することを目的とする。さらに、酸素濃度依存性 ATP 遊離量を赤血球で定量的に測定する方法を提供することを目的とする。

- 10 本発明者は、上記課題を解決するため誠意研究を行った結果、T 型又は R 型にヘモグロビンの構造を安定化することにより、酸素分圧に関係なく、あるいは望みの酸素濃度で ATP の遊離を制御し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- 15 (1) 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態に安定化させる物質を含む、赤血球からの ATP 遊離促進剤。

赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質としては、例えばベザフィブラート、一酸化窒素、二酸化炭素及びアデノシンからなる群から選択される少なくとも 1 つが挙げられる。上記 ATP の遊離は、100 mmHg 以下の酸素分圧下において行うことができる。

- 20 (2) 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。

赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質、及び ATP を遊離させる酸素分圧は、(1)に示したものと同様である。本発明の医薬組成物は、例えば血管拡張薬又は血流改善薬として使用される。

- 25 (3) 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態に安定化することを特徴とする、赤血球から ATP を遊離させる方法。

ATP の遊離は、酸素分圧は 100 mmHg 以下において行うことができる。

(4) 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質を含む、赤血球からの ATP 遊離抑制剤。

赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質としては、一酸化炭素又はスルフォニルウレアが挙げられる。また、ATP の遊離の抑制は、100

5 mmHg 以下の酸素分圧下において行うことができる。

(5) 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。

赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質、及び ATP の遊離を抑制する酸素分圧は、上記(4)に示したものと同様である。この場合、本発明
10 の医薬組成物は、例えば血管収縮薬、血流制御薬又は血管拡張阻害剤として使用することができる。

(6) 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態に安定化することを特徴とする、赤血球からの ATP の遊離を抑制する方法。

ATP の遊離の抑制は、100 mmHg 以下の酸素分圧下において行うことができる。
15 る。

(7) ヘモグロビンの構造が T-状態で安定化された赤血球。

この場合、本発明の赤血球としては、ベザフィブラート、一酸化窒素、二酸化炭素、アデノシン及び水素イオンからなる群から選択される少なくとも 1 つの物質で処理された赤血球が挙げられる。また、ATP の遊離は、100 mmHg 以下の
20 酸素分圧下において行うことができる。

(8) ヘモグロビンの構造が R-状態で安定化された赤血球。

この場合、本発明の赤血球としては、一酸化炭素又はスルフォニルウレアで処理された赤血球が挙げられる。

ATP の遊離の抑制は、100 mmHg 以下の酸素分圧下において行うことができる。
25 る。

(9) 前記(7)記載の赤血球を含む医薬組成物。

この場合、本発明の医薬組成物は、虚血性疾患（例えば出血性ショック、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、閉塞性動脈疾患、糖尿病による血管障害、冠動

脈狭窄症、四肢虚血性疾患、閉塞性動脈硬化症及び虚血性潰瘍・壊死からなる群から選択される少なくとも1つ)又はアシドーシスを治療するために使用することができる。前記虚血性疾患は、虚血・再灌流症候群(例えばショック後蘇生、臓器冷保存後灌流、外科手術後血流再開通、及び閉塞血管の再建からなる群から

5 選択される、少なくとも一つの原因により起こるもの)でもよい。

(10) 前記(8)記載の赤血球を含む医薬組成物。

この場合、本発明の医薬組成物は血管拡張性疾患(例えば、敗血症ショック又はアナフィラキシーショック)を治療するために使用することができる。

10 (11) 赤血球から遊離された ATP 量を酸素濃度依存性に定量することを特徴とする ATP の測定方法。

(12) 赤血球浮遊液にアデノシンを添加し、得られる浮遊液を無酸素又は低酸素分圧条件下に曝すことを特徴とする、赤血球からの ATP の遊離を増強させる方法。

無酸素又は低酸素分圧条件は、例えば 0 mmHg~150 mmHg の条件であり、アデノシンの濃度は、例えば $0.1 \mu\text{mol/L}$ ~ $10 \mu\text{mol/L}$ である。

15 (13) 赤血球浮遊液にアデノシンを添加し、得られる浮遊液を 60 mmHg~80 mmHg の二酸化炭素分圧条件下に曝すことを特徴とする、赤血球からの ATP の遊離を増強させる方法。

アデノシンの濃度は、例えば $0.1 \mu\text{mol/L}$ ~ $10 \mu\text{mol/L}$ である。

20 (14) アデノシンが添加された赤血球浮遊液に、バンド 3 タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質(例えばスルフォニルウレア)を添加することを特徴とする、赤血球からの ATP の遊離を制御する方法。

スルフォニルウレアとしては、例えば 4,4'-ジイソチオシアネート-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸(DIDS)が挙げられる。

25 (15) バンド 3 タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質(例えば DIDS 等のスルフォニルウレア)を含む、赤血球からの ATP 遊離制御剤。

本発明の制御剤は、例えば ATP の遊離を抑制するために使用することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、酸素分圧と ATP 遊離との関係並びに飽和 CO 及びペザフィブラートの赤血球遊離作用を示す図である。

図 2 は、酸素分圧と ATP 遊離との関係並びに飽和 CO 及び α NO-Hb の赤血球遊離作用を示す図である。

図 3 は、ラットの全身血液体積の 40% を脱血させた後に T-状態安定化赤血球を戻して 60 分後の肝臓微小循環の有効循環類洞密度 (FSD)、Base excess 及び胆汁分泌の回復を示す図である。

図 4 は、細胞外液にアデノシンを添加したときの ATP 放出量を測定した結果を示す。

図 5 は、アデノシンの濃度依存的な ATP 放出作用を示す図である。

図 6 は、R-状態における ATP 遊離を示す図である。

図 7 は、一酸化炭素処理赤血球からの ATP 遊離に対する DIDS の抑制効果を示す図である。

図 8 は、ATP 遊離に対する DIDS の用量依存的な効果を示す図である。

図 9 は、各酸素分圧下における DIDS の ATP 遊離抑制効果を示す図である。

図 10 は、二酸化炭素の分圧依存的な ATP 遊離増加を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

組織が低酸素状態になると赤血球からアデノシン 3 リン酸 (ATP) が放出され、放出された ATP は、血管内皮細胞表面に発現する特異的受容体を介してカルシウム濃度を上昇させ、一酸化窒素 (NO) 及びプロスタサイクリンの合成と遊離を促進する。このことは、この NO とプロスタサイクリンにより血管拡張作用が生じ

ることを意味している。

一方、血漿中に出た ATP はアデノシン 2 リン酸 (ADP) に分解され、血小板凝集と接着を活性化する。これは止血が生じることを意味している。

このように、赤血球から ATP が遊離されることは、生体内の生理機能にとっ

て極めて重要である。しかしながら、その酸素濃度依存性と生理機能の機序との関係はこれまで明らかにされていなかった。また、赤血球が低酸素分圧部位に到達したときに、血管拡張物質である ATP を放出して病巣に到達する能力を持っていることを分子論的に証明した研究は無かった。

- 5 そこで本発明者は、赤血球からの ATP の遊離が低酸素分圧下でどのように起こるかという点に着目して鋭意研究を行った。

1. ATP 遊離とヘモグロビンアロステリーとの関係

- 10 赤血球からの ATP 遊離パターンは、酸素分圧との関係で酸素解離曲線と同様のシグモイド曲線を描いた。ここで、酸素解離曲線とは、酸素分圧に対する、酸素と結合したヘモグロビンの割合を示す曲線を意味する。この ATP 遊離パターンは赤血球中のヘモグロビン(Hb)アロステリーに依存しており、ATP の遊離パターンは Hb のシグモイド曲線のパターンと類似していた。そこで、本発明者は、赤血球 ATP 放出反応における酸素依存性は、ヘモグロビンが酸素濃度を感知してこの現象を引き起こすためであると考えた。そして、ヘモグロビンの構造を T 型又は R 型構造に安定化させて赤血球からの ATP 遊離を測定した。その結果、R 型は ATP 放出を抑制し、T 型は ATP 放出を活性化し、前記考察が証明された。

- 15 ヘモグロビンは酸素の運搬体として機能する分子量 64,500 のタンパク質である。ヘモグロビンの酸素との結合親和性は、ヘモグロビンの構造と関係する。つまり、ヘモグロビンは低酸素分圧下では T 型構造（「T-状態」という）を、また高酸素分圧下では R 型構造（「R-状態」という）をとる。ここで「T-状態」とは、ヘム 5 配位であって酸素に対し低親和性（末梢で酸素が離れやすい）の構造を意味する。また、「R-状態」とは、ヘム 6 配位であって酸素に対し高親和性（末梢で酸素が離れにくい）の構造を意味する。

- 25 ヘモグロビンを T-又は R-状態に安定化させる薬物は、いくつか見出されている。そこで、これらの薬物を用いてヘモグロビンアロステリーを T-状態又は R-状態に安定化したときの ATP 遊離パターンを調べるため、ヘモグロビンを T-状態に安定化させることが知られている NO 誘導体を用いて検討を行った

(Yonetani, T. et al., J. Biol. Chem., 273(32), 20323-20333(1998))。

この NO 誘導体を酸素非存在下でヘモグロビンに添加すると、赤血球は酸素分圧にかかわらず、ATP を一定して放出した。また、ヘモグロビンを R-状態に安定化させることが知られている一酸化炭素 (CO) を用いて同様に測定すると、赤血球は酸素分圧にかかわらず、ATP を殆ど遊離しなかった。従って、ヘモグロビンの構造を T-状態又は R-状態に安定化すると、酸素分圧とは無関係に ATP 遊離を調節し得ることを見出した。このことは、血中の酸素分圧の低下によりヘモグロビンの構造が T-状態に移行するとき、又はヘモグロビンの構造を T-状態に安定化させたときは、血管拡張作用を有する ATP を効果的に赤血球から遊離させることができることを意味する。また、血中の酸素分圧の増加によりヘモグロビンの構造が R-状態に移行するとき、又はヘモグロビンの構造を R-状態に安定化したときは、赤血球からの ATP の遊離を抑制させることができることを意味する。

図 1 に示すように、ヒト赤血球は酸素分圧が低下すると ATP を細胞外に放出する。その能力は、酸素分圧が 50~70 mmHg を境界 (変曲点) とするシグモイドカーブを示すことから、本発明者は酸素濃度のセンシングをヘモグロビンが行っていることを想定した。そして、ヘモグロビンの構造をいわゆる R-状態 (ヘム 6 配位) に安定化する CO で赤血球を飽和させると、この能力は完全に消失した。一方、ヘモグロビンの構造をいわゆる T-状態 (ヘム 5 配位) に安定化するベザフィブラート (bezafibrate) (100 μ mol/L 30 分処理) は正常酸素濃度でも多くの ATP を放出する赤血球に変化させた。

さらに図 2 に示すように、T-状態に安定化する NO を酸素非存在下でヘモグロビン 0.5 当量で添加すると、赤血球は酸素濃度に関わらず ATP を一定して放出するようになった (「 α NO-Hb」のグラフ)。

従って、ヘモグロビンを T-状態に安定化させた赤血球は、虚血・再酸素化障害を軽減する効果を示すと考えられる。虚血・再灌流が生じ得る臓器又は組織としては、例えば心臓、肝臓、脳、肺、腎臓、血管、骨格筋、脾臓、胃、小腸、大腸などを挙げることができるがこれに限定されるものではない。特に、肝臓における虚血・再灌流障害において、赤血球は胆汁分泌の回復を劇的に改善させる効果

を發揮する。このことは、ラットの全身血液体積の 40%を脱血させ、15 分後に同量のヘモグロビンを赤血球又は T-状態安定化赤血球で戻したときの肝臓微小循環動態を検討することによって明らかとなった（後述）。つまり、T-状態安定化赤血球を戻す時に得られる効果が、正常の赤血球で得られる効果よりも、有効循環類洞密度(functional sinusoidal density(FSD))、アシドーシスの改善、胆汁分泌の回復率で上回ることが示された（図 3）。

また、献血血液は一般に 4℃で保存されるが、このような低温保存下ではそれだけでヘモグロビンは R-状態となる。さらに、低温保存時に一酸化炭素ヘモグロビン(COHB)にすると、ATP の放出を抑制して、赤血球のエネルギーを温存することもできる。このような R-状態にある赤血球に T-状態安定化剤を添加すると ATP の放出を活性化した。つまり、R 状態にある赤血球又は一酸化炭素飽和赤血球においても ATP 放出回復効果が認められた。さらにまた、上記の肝臓における虚血・再灌流障害において、一酸化飽和赤血球によって、有効循環類洞密度をショック前の 90%にまで回復することが示された（図 3）。このことは、CO を末梢組織に運ぶ担体として赤血球を使用できることを意味する。

上記のことから、ヘモグロビンの T-R transition を調節する薬剤は、赤血球の酸素放出能を惹起するのみならず、生体の抵抗血管で起こりうる酸素分圧の低下に呼応して ATP を放出させる能力があるといえる。従って、T-R transition を変化させることのできるすべての薬剤、及びこれらの薬剤により処理された赤血球は、ATP 放出を活性化し得る、付加価値のついた血液として本発明に含まれ、「付加価値輸血」に使用することができる。

ATP は生体内では血管内皮細胞に作用し、NO を増加させて血流を増加させる。また、肝臓では肝細胞膜に ATP が作用して毛細胆管の律動的収縮が活性化して胆汁分泌が活性化する。さらにまた、T-状態安定化剤は、赤血球が低酸素環境に到達すると發揮する生物作用、すなわち酸素放出と血管拡張を増強してショックを改善する生物作用を有することから、末梢循環改善薬として使用することができる。

2. T-状態又はR-状態安定化

(1) 安定化物質

本発明において、ヘモグロビンをT状態に安定化させて赤血球からATPを遊離させる作用を持つ物質（「T-状態安定化物質」という）としては、例えば、

- 5 Bezafibrate、NO、NO誘導体、二酸化炭素、アデノシン、水素イオン等を挙げることができる。これらの物質の少なくとも1つを、単独で又は適宜組み合わせて使用することができる。但し、T-状態安定化物質は上記例示した物質に限定されるものではない。

- 10 T-状態安定化物質は、赤血球からATPを遊離させる作用を有する限り、上記に挙げた薬物の一部改変体又は誘導体でもよい。

- ヘモグロビンをT状態に安定化する方法は公知であり（Kilmartin JV, Rossi-Bernardi L, Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates. Physiological Review, vol.53, 836-890 (1973)), 例えば二酸化炭素、ATP、イノシトールヘキサキスホスフェート(Inositol
15 hexakisphosphate)、水素イオン(H^+)、塩素イオン等(Cl^-)で処理することにより行うことができる。

- また、ヘモグロビンをR状態に安定化させて赤血球からのATPの遊離を抑制する作用を持つ物質(R-状態安定化物質という)としては、例えば一酸化炭素(CO)、スルフォニルウレアを挙げることができる。但し、R-状態安定化物質は上記例示
20 した物質に限定されるものではない。

(2) ATPの遊離又はその抑制

上記のようにT状態に安定化された赤血球は、ATPを遊離する機能を有する。

- 「ATPを遊離する」とは、ATPの放出曲線が、酸素分圧との関係でヘモグロビンに観察される通常のシグモイド曲線をとらず、少なくとも、変曲点よりも高い
25 酸素分圧（例えば100 mmHg PO_2 ）において、前記通常のシグモイド曲線により示されるATP放出量よりも多量のATPを放出することを意味する（例えば図1の「bezafibrate」の曲線）。従って、そのようなATP放出曲線を描く限り、上記通常のシグモイド曲線がとる変曲点以下の酸素分圧の場合は、そのシグモイド

曲線により示される ATP 放出量と同量でも、それよりも多量でも、少量でもよい。但し、本発明においては、ATP 放出の促進は、酸素分圧 100 mmHg 以下、好ましくは 40~80 mmHg において行われる。

また、R-状態に安定化された赤血球は、ATP の遊離を抑制する機能を有する。

- 5 「ATP の遊離を抑制する」とは、ATP の放出曲線が、酸素分圧との関係でヘモグロビンに観察される通常のシグモイド曲線をとらず、放出される ATP 量は、少なくとも、その通常のシグモイド曲線がとる変曲点以下の酸素分圧においてそのシグモイド曲線により示される ATP 放出量よりも少量であることを意味する（例えば図 1 の「CO-Hb」の曲線）。従って、そのような ATP 放出曲線を描く
- 10 限り、変曲点よりも高い酸素分圧では、前記通常のシグモイド曲線により示される ATP 放出量と同等でも、それよりも少量でも、多量でもよい。但し、本発明においては、ATP 放出の抑制は、酸素分圧 100 mmHg 以下、好ましくは 40~80 mmHg において行われる。なお、細動脈の酸素分圧は前記の 40~80 mmHg である。

15

3. アデノシンの添加と ATP 放出との関係

(1) 酸素分圧との関係

アデノシンは、塩基部分にプリン誘導体であるアデニンを含むヌクレオシドの一つであり、ATP の原料となる。

- 20 アデノシンは細胞内外を通過する輸送系により細胞内に取り込まれることから、本発明者は、赤血球の浮遊液にアデノシンを添加することを考えた。

その結果、細胞外液にアデノシンを添加すると、無酸素又は低酸素条件下において ATP 遊離（放出）が増強することを見出した。特に、細胞外液に 1 μ mol/L のアデノシンを添加して 5 分間処理し、1 分の低酸素又は無酸素条件に曝すと、

- 25 ATP 放出量が約 2 倍増強された。

このことは、例えば輸血用血液にアデノシンを添加しておくことで、ATP 遊離能の高い保存血の取得につながることを意味し、アデノシン添加血液は、救急医療や手術時の輸血製品として有効に利用できる点で極めて有用である。

本発明において赤血球浮遊液中に添加されるアデノシンは、 $0.1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 、好ましくは $1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$ である。

ここで、「無酸素条件」とは、酸素分圧が 0 mmHg であることを意味し、「低酸素条件」とは、 0 mmHg よりも大きく正常の酸素条件(150 mmHg 、空气中)以下

5 下の条件を意味する。

上記酸素分圧で血液浮遊液を $10 \sim 60$ 分処理することにより、ATP 放出を増強することができる。

(2) 二酸化炭素分圧との関係

10 二酸化炭素 (CO_2) には、「hypercapnic protection」と呼ばれる作用、すなわち機械呼吸で換気を人為的に少なくして CO_2 分圧を上昇させると、ARDS (成人呼吸促迫症候群、Adult respiratory distress syndrome) の予後を改善する作用があることが知られているが、そのメカニズムは不明であった。

本発明においては、通常の酸素分圧 (Normoxia) 下において CO_2 分圧を変化させることにより、ATP 放出を増強することができることが明らかにされた。

15 CO_2 分圧は、好ましくは $60 \sim 80 \text{ mmHg}$ である。

(3) Anion exchanger との関係

20 赤血球の膜には、「Band III」 (バンド 3) と呼ばれる膜貫通糖タンパク質が存在する (赤血球当たり約 10^6 個)。このタンパク質は、N 末端側の親水性ドメイン及び C 末端側のドメインの 2 つの機能ドメインに分かれている。N 末端側の親水性ドメインは、アンキリンを介して細胞骨格系と連結しており、赤血球の形態維持に関与する。C 末端側のドメインは、膜を 14 回貫通する膜内ドメインであり、陰イオン透過機能、すなわち、 Cl^- と HCO_3^- の交換反応を媒介し、 CO_2 ガスの運搬及び排出という機能を担う。この機能を担う膜タンパク質を、「Anion exchanger」と呼ぶ。

25 本発明者は、細胞外への ATP 放出が上記 Anion exchanger を介して行われることを見出したため、上記 Anion exchanger の抵抗を上げることにより、その機能 (陰イオン透過機能) を阻害することにより、ATP の放出量を制御できると考えた。

上記 ATP 放出の制御は、BandIII の細胞外ドメインに結合し、陰イオン透過機能を阻害する物質（薬物、低分子化合物）であれば特に限定されるものではない。

BandIII の細胞外ドメインに結合する薬物としては、例えば糖尿病の治療に用いられるスルフォニルウレアである DIDS (4,4'-ジイソチオシアネート-スティルベン-2,2'-ジスルホン酸：4,4'-diisothiocyanate-stilbene-2,2'-disulfonic acid) などが挙げられるが、DIDS が好ましい。上記 BandIII の細胞外ドメインに結合する物質を赤血球浮遊液に添加することにより、ATP の放出量を制御することが可能である。

例えば DIDS の量は、好ましくは $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L となるように赤血球浮遊液に添加する。

上記(1)及び(2)で述べた反応は、BandIII の細胞外ドメインに結合する物質により制御される。従って、当業者は、酸素分圧及び二酸化炭素分圧を考慮して、適宜 ATP 放出量を制御することができる。

15 4. 医薬組成物

本発明において、赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質は、赤血球からの ATP 遊離を促進するため、血管拡張薬又は血流改善薬等の医薬組成物として使用することができる。

また、赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質は、赤血球からの ATP 遊離を抑制するため、血管収縮薬、血流制御薬又は血管拡張阻害剤として使用することができる。

上記 T-状態で安定化させる物質、及び R-状態で安定化させる物質を、本発明では「T-R transition 調節薬」という。

さらに、本発明においては、上記 T-R transition 調節薬で処理された赤血球を提供する。この赤血球は、T-状態又は R-状態に調節され、ATP の遊離を促進又は抑制できるようになっているため、医薬組成物として使用することが可能である。

本発明の医薬組成物のリソースとなる赤血球は、献血保存血、自己血輸血用血

液が望ましいが、これに限定されるものではない。

(1) T-R transition 調節薬

本発明の T-R transition を調節する薬剤を ATP 遊離促進剤又は ATP 遊離抑制剤として使用する場合は、通常の静脈内又は動脈内等の全身投与、あるいは手術後の再建血管からの局所投与をすることができる。

従って、カテーテル技術、外科的手術等と組み合わせた投与形態を採用することも可能である。

T-状態で安定化させる物質は、血管拡張又は血流改善に寄与する。従って、T-状態で安定化させる物質を投与する対象となる疾患は、例えば虚血性疾患及び循環器系疾患であり、それらの例として、出血性ショック、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、閉塞性動脈疾患、糖尿病による血管障害、冠動脈狭窄症、四肢虚血性疾患、閉塞性動脈硬化症、虚血性潰瘍・壊死、虚血・再灌流症候群（ショック後蘇生、臓器冷保存後灌流、外科手術後血流再開通、及び閉塞血管の再建など）、虚血性心疾患、消化管出血、DIC（播種性血管内凝固症候群）、外傷性ショック、多臓器不全などが挙げられる。このほか、アシドーシスやショックの治療、改善に用いることもできる。

R-状態で安定化させる物質は、血管収縮又は血流抑制に寄与する。従って、R-状態で安定化させる物質を投与する対象となる疾患は、血管拡張性疾患、例えば敗血症、アナフィラキシーショック、エンドトキシンショックである。

上記薬剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えば出血性ショックの場合の投与量は、1日1回あたり10 g/dlの調製下で800 mlであり、1回又は複数回投与される。複数回投与の場合は、1日あたり3～4回に分けてもよい。

本発明の T-R transition 調節薬は、献血用に体外に出された血液に添加することもでき、その場合は、血液 Hb 濃度 10 g/dl 200 ml あたり 5～10 ml である。

(2) T-R transition を調節する薬剤で処理された赤血球製剤

(2-1) ヘモグロビンアロステリー

救急救命に必要な酸素輸液の開発研究は、これまで期限切れ残余献血血液から

ヘモグロビンを精製し、これを生体適合性材料を用いて修飾あるいは封入した製剤の開発が主体であった。

近年の研究により、赤血球が血管内の酸素濃度を感知して NO などの低分子のガスや有機酸を活発に放出又は回収し、その一部が血管拡張や血小板活性化制御
5 に関与する可能性が示されつつある。これは、赤血球が酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与するだけでなく、積極的に微小循環血流維持作用を発揮している可能性を示すものである。換言すれば、これまでの精製ヘモグロビン修飾体による人工酸素運搬体では、赤血球が本来保持しているこのような付加価値機能を完全に補完することはできないことを意味している。このような血管作動物質のシンク
10 リザーバーとしての赤血球が血管機能制御に関与することを示す分子機構の解明は、特にショックの救急救命への応用を考える上で極めて重要であり、細胞膜機能を維持したまま、高い酸素運搬能と微小循環血流保持機能を付与した新しい赤血球製剤開発が不可欠である。

本発明は、膜透過性の高い低分子ガス（例えば NO, CO）による蛋白質機能修飾技術を利用した赤血球保存技術の向上と付加価値添加技術による、篤志で得られた献血血液の有効利用を展開する。具体的には α -NOHb（NO で固定したヘモ
15 グロビン）あるいは CO-Hb（CO で固定したヘモグロビン）を利用し、少ないヘモグロビン量で、多量のヘモグロビンが有する酸素の量と同等の量の酸素を運搬できるような赤血球製剤の実用的創製法、あるいは新規赤血球保存法をそれぞれ
20 開発し、これらのプロダクトの実用化を目指すことを目的とする。

本発明では、血液製剤を投与される個体においてヘム解毒の負担を軽減することが出来るメリットも見逃せない。正常個体と異なり、外科手術後やショック病態ではサイトカイン血症や低酸素ストレスによりヘム解毒酵素である heme
oxygenase が誘導され、ヘムからビリルビンへの分解が異常に亢進することから
25 (Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M. Gastroenterology. 120, 1227-1240 (2001))、酸素輸送量あたりのヘムの絶対量を低下させることは、単に血液資源の節約という観点のみならず、それを投与される個体の高ビリルビン血

症のリスクを軽減させることにつながるからである。

- また、NO-Hb は、移植用グラフトの酸素化フラッシュ液として新規に応用することができる。通常、低温（4℃）の状態では Hb heme と分子状酸素の affinity は増加するため、再灌流時の酸素輸送の向上には α -NOHb が適している。また
- 5 再灌流時に生じる oxygen paradox を軽減するためには、逆に CO-Hb の応用が可能である。さらにラジカル分子でない CO は mild vasorelaxant として応用が可能であり、組織に Hb よりも CO affinity が高いヘム蛋白が存在する筋肉や脳では Hb-CO による血管拡張効果が期待できる。このような可能性も、本発明において実験的に評価することにより、残血赤血球の新たな需要の創出に結びつける
- 10 ことができる。本発明において提案する α NO-RBC、CO-RBC の有効利用を行うことは、救急救命の Quality を向上させると共に、国民の篤志で得られた貴重な血液リソースの有効利用を考える上で極めて重要である。

- Hb allosteric 修飾による付加価値赤血球製剤を開発するには、(i) 血液体積の 50% を占める赤血球が単なる酸素運搬体として働くばかりでなく、微小循環局
- 15 所の酸素分圧変化や shear stress を感知して血管拡張物質を放出したり、血管収縮物質を吸収したりする metabolic sink として作用していること、特に酸素の脱着等による Hb allosteric 変化が本機能を制御しているという仮説の検証とその機構を解明すること、並びに、(ii) この概念を人工酸素運搬体に導入し、実用化を目指す必要がある。上記(i)記載の内容を実証するために、本発明では α
- 20 NO-Hb 又は CO-Hb による出血性ショックの蘇生効果を検討する。また、上記(ii)記載の内容を検討するために、本発明では Hb を修飾した赤血球を実験動物に適用する。

(i) α NO-Hb, CO-Hb による出血性ショックの蘇生効果の検討

- ラットの Wigger's hemorrhagic shock protocol にしたがって 40% 脱血性シ
- 25 ョックを惹起し、 α NO-Hb, CO-Hb を持つ赤血球（同種ラットから分離調整したもの）により蘇生を試みた。回復効果は肝臓微小循環の生体顕微鏡学的解析系を用いて比較検討した。微小循環の酸素供給だけでなく functional capillary density (FCD)、白血球接着、Kupffer cell activationなどを指標として比較検討

した。また、Wigger's hemorrhagic shock protocol にしたがってラットを用いて 40% 脱血性ショックを惹起し、 α NO-Hb, CO-Hb を持つヒト赤血球（ヒト末梢血から分離調整したもの）により蘇生を試みた。

酸素乖離曲線は、2,3-DPG をはじめとする生体内分子や合成化合物の存在により右（または左）偏移することが古くより知られている。膜透過性に優れ Hb の 5 ヘムに結合する NO、CO 等のガス状分子も Hb allosteric 調節分子である。

(ii) Hb を修飾した赤血球の実験動物への適用

ラット Wigger's hemorrhagic shock protocol に従って 40% 脱血ショックを誘起し、 α NO-RBC による蘇生を試みた結果、 α NO-RBC には毛細血管レベルで 10 の開口性 (patency) を著しく改善し、胆汁分泌を著明に回復させる効果を確認した。また、本来酸素輸送能がないと考えられる CO 飽和赤血球にも CO の結合していない通常の赤血球と同様の改善効果が確認された。また、ヒト末梢血を用いた検討では、 α NO-RBC、CO 飽和赤血球及び通常の赤血球は全身のアシドーシスに対する改善効果を示すことが確認された。

15 (2-2) T-状態に安定化させた赤血球

以上のことから、本発明において作製された赤血球のうち、T-状態に安定化させた赤血球は、血管拡張、血流改善の治療に用いる医薬組成物として使用することができる。また、本発明において作製された赤血球は、虚血性疾患のほか、アシドーシスやショックの治療、改善に用いる医薬組成物として使用することがで 20 きる。

本発明の赤血球は、免疫適合性とするために治療目的のレシピエント個体から得てもよく、ボランティアからの献血を用いてもよい。本発明において使用される赤血球は哺乳動物赤血球であり、好ましくはヒト赤血球である。

本発明の赤血球を含む医薬組成物は、例えば、以下の組織に生じる疾患について 25 て治療、予防または、検査を特異目的として用いることができる。

消化器系：口腔、咽頭、食道、胃、小腸、大腸、肝臓、すい臓など

呼吸器系：気管、気管支、肺など

泌尿器系：腎臓、膀胱など

心臓血管系：心臓、動脈、静脈

リンパ系：リンパ管、リンパ節、脾臓、胸腺

中枢神経系：脳（大脳、間脳、中脳、小脳）、延髄、脊髄

筋：骨格筋、平滑筋等

- 5 これらの疾患は、単独であっても、併発したものであっても、上記以外の他の疾病を併発したものであってもよく、いずれも本発明の医薬組成物の使用対象とすることができる。本発明においては、例えば血管拡張、血流改善又はショック改善の目的とすることが好ましい。

- 10 また、本発明においては、ATPを遊離する薬物を含有する赤血球を、虚血性疾患や循環器系疾患を治療するための医薬組成物として使用することができる。

- 15 虚血性疾患及び循環器系疾患としては、例えば出血性ショック、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、閉塞性動脈疾患、糖尿病による血管障害、あるいは、冠動脈狭窄症、四肢虚血性疾患、閉塞性動脈硬化症、虚血性潰瘍・壊死、虚血・再灌流症候群、虚血性心疾患、消化管出血、DIC（播種性血管内凝固症候群）、外傷性ショック、多臓器不全などが挙げられる。前記の虚血・再灌流症候群には、ショック後蘇生、臓器冷保存後灌流、外科手術後血流再開通、及び閉塞血管の再建からなる群から選択される、少なくとも一つの原因により起こるものが挙げられる。本発明の医薬組成物は、これらの疾患を治療するために用いられ、血流改善薬、または血管拡張薬としての作用を有する。

- 20 また、本発明の医薬組成物は、酸塩基平衡障害（例えばアシドーシス）の治療薬あるいはショック改善薬として治療に用いられる。

赤血球は、前記の通り酸素濃度変化によるヘモグロビンのアロステリー変化を介して、ATPを細胞外に遊離している。具体的には、赤血球は低酸素状態ではATPを遊離しやすく、酸素飽和状態ではATPを遊離しにくい。

- 25 従って、血流の滞った箇所、例えば血管が血栓、血管肥厚、血管狭窄、血管閉塞等によって血液を通す容量が減少した又は無くなった箇所では、酸素を十分に含む新鮮血液を供給することができないため、そのような血流の滞った箇所の血液は低酸素状態になる。また、出血ショックによっても、低酸素状態を引き起こ

- す。さらに、癌細胞の中心部分では、血管系が未発達であるため酸素の供給が十分ではなく、癌細胞が低酸素状態にある。このため、放射線治療では効率よく酸素ラジカルを産生できず、十分な治療効果を出すことができないという問題がある。さらに、細胞は多くの酸素を必要としているため、酸素の供給が止まった場合（例えば血流が断絶した場合）は、脳梗塞や心筋梗塞などの重篤な症状に至ることがある。

本発明の赤血球は、そのような低酸素状態において ATP を効果的に供給し、臓器血流を維持することを可能とするものである。

- また、大腸鏡による腸の検査及び／又は治療においては、空気で腸をふくらませるために、腸に圧力がかかり血流が悪くなり、腸の細胞は低酸素状態にさらされる。そこで、用いるガスに二酸化炭素を多く含ませることにより、本発明の赤血球は ATP を供給し、腸の低酸素状態を改善することが可能となる。

- 赤血球内で産生され遊離した ATP は、血管内皮細胞にある特異的受容体に作用し、NO やプロスタサイクリンを増加させて血管を弛緩、拡張させる。従って、血流の滞った血管を弛緩、拡張させることで血流を改善させることができる。

また、遊離した ATP は、血液内で速やかに ADP に分解される。分解によって産生された ADP は、血小板に存在する特異的受容体を介して血小板の凝集を引き起こす。従って、出血によって起きる低酸素状態を示す部位を、上記の機序によって効果的に止血をすることができる。

- 本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えば肝疾患手術後の出血性ショックの場合の投与量は、1日1回あたりヘモグロビン 20 g/dl の濃厚パックで 200～800 mL 程度であり、1回又は複数回投与される。複数回投与の場合は、1日あたり 3～4回に分けてもよい。

25 (2-3) R-状態に安定化させた赤血球

本発明において作製された赤血球のうち、R-状態に安定化させた赤血球は、敗血症ショック、アナフィラキシーショックなど全身血管拡張が著しい病態（血管拡張性疾患）の治療に用いる医薬組成物として使用することができる。

上記(2-2)に記載したように、T-状態に安定化された赤血球を含む医薬組成物は、出血性ショックの治療に有効である。このことは、R-状態に安定化させた赤血球とT-状態に安定化させた赤血球のいずれかを、ショック状態により使い分けることできることを意味している。

- 5 本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えば敗血症ショック又はアナフィラキシーショックの場合の投与量は、1日1回あたりヘモグロビン 20 g/dlの濃厚パックで200～800 mL程度であり、1回又は複数回投与される。複数回投与の場合は、1日あたり3～4回に分けてもよい。

10

5. 血液酸素含有量の測定方法

本発明により、赤血球は酸素濃度と ATP 放出量との関係ではヘモグロビンの酸素解離曲線と同様のシグモイド曲線を描くことが判明した。従って、本発明において低酸素性 ATP 放出量を測定することで、赤血球機能予備能の間接的測定

15 が可能である。

本発明の血液酸素含有量の測定方法は、臨床検査、治療の場において有効である。また、本発明の測定方法を用いると、輸血血液の含有酸素量の測定又は汚血検査を簡便に実施することが可能となる。

- 20 用いる血液は、酸素含有量の測定対象から摂取する血液を利用する。摂取後速やかに ATP を測定することが望ましい。採取量は、5～400 ml、好ましくは5～10 ml である。

血中 ATP の測定には、市販の測定機器に測定対象血液を適用すればよい。

- 25 酸素含有量と血中 ATP 量の関係式をあらかじめ求めておき、求めた関係式に、測定で得られた血中 ATP 量を代入することで、試料中の酸素含有量を求めることができる。

次に、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

ヒト末梢血 20 mL をヘパリン採血し、2000rpm、7 分で遠心して赤血球沈渣を採取し、洗浄して 1×10^7 cells/ml の赤血球浮遊液を Krebs buffer で作製した。

酸素濃度を 0~150 mmHg で所望の値に調整した Krebs buffer 1.8 mL を含む密

- 5 封キュベットを 37℃ でインキュベートし、マイクロリシンジで 200 μ l の赤血球浮遊液を密封キュベットに注入した。5 分後に 4℃ の氷中に入れて反応を停止し、サンプル 200 μ l を 4℃ のまま採取し、遠心して上清中の ATP を luciferin assay により定量的に測定した。正常赤血球は酸素分圧(PO_2)50~70 mmHg 付近に変曲点を持つカーブになる (図 1 のシグモイド曲線)。赤血球に 100 % CO を 1 分間
10 通気して作製した CO 飽和赤血球は低位で ATP 放出が一定化し (図 1 「CO-Hb」の曲線)、 10^{-4} mol/L (最終濃度) で処理した bezafibrate は高位で ATP 放出が一定化した (図 1 「bezafibrate」の曲線)。図 1 中、「*」は正常酸素分圧(150 mmHg、空気中)時の測定値に対して有意に差があることを示す($P < 0.05$)。

15 実施例 2

本実施例では、一酸化炭素赤血球(CO-Hb)及び NO 処理赤血球(α NO-Hb)の ATP 放出に対する影響を検討した。方法は上記実施例 1 に従った。NO の作用は、摂取した赤血球をアルゴン通気により完全脱酸素した後、NO-glutathione を Hb 濃度に対して 1 : 2 の割合で添加し、数分後に遠心して回収した赤血球を用いて
20 実験を行った。前記赤血球に含まれるヘモグロビンは「 α NO-Hb」と表示した。

正常-Hb 及び CO-Hb は実施例 1 と同様の結果を示し (図 2)、 α NO-Hb は実施例 1 の bezafibrate よりもさらに高位で ATP の放出が一定化した (図 2)。図 2 中、「*」は正常赤血球(Hb)に対して有意に差があることを示す($P < 0.05$)。

25 実施例 3

ヒト洗浄赤血球試料によるラット 40%脱血ショック惹起性肝臓機能障害に対する回復効果

Wistar 系雄性ラット(250~300 g)を Pentobarbital sodium 50 mg/kg で筋注麻

酔した。麻酔したラットの気管を切開し、大腿動脈にカテーテルを挿入した。さらに、総胆管にカテーテルを挿入し、胆汁分泌をモニターした。脱血ラインとして左頸動脈にもカニューレーションし、1~2 mL/min で脱血し、総脱血量が全身血液の 40%になるまで脱血を続けた。脱血終了後 15 分のショック状態の後、各製剤を出血量に相当する Hb 量を調整して投与し、60 分後に肝臓微小循環、胆汁流量、および動脈血の Hb、重炭酸濃度 pH より base excess を算出した (図 3)。Base excess は通常、プラス 2.5 以上がアルカローシス (alkalosis)、マイナス 2.5 以下がアシドーシス (acidosis) を意味する。図 3 中、PS は出血量に相当する量を生理食塩水で蘇生 (n=7)、COhRBC は CO 飽和ヒト赤血球で蘇生 (n=5)、hRBC は 空気飽和ヒト赤血球で蘇生 (n=5)、及び α NOhRBC はアルファサブユニットが NO で飽和された Hb を持つヒト赤血球で蘇生 (n=7) したものである。また、図 3 中、「*」は *P<0.05 (PS 群に比べて有意な変化) を、「#」は #P<0.05 (hRBC 群に比べて有意な変化) を示す。肝臓微小循環は、既報のビデオ強化型倒位型生体顕微鏡システムによりその動態を記録した。

まず各赤血球製剤を投与した際、肝臓の微小循環に当たる類洞血流が維持されている血管の密度は 3 種類の製剤を投与したいずれの群においても著明な改善効果が確認された (図 3 上パネル)。特に酸素を運搬できないと考えられる CO 飽和赤血球 (COhRBC) では肝臓の有効循環類洞密度はショック前の約 90%まで回復した。これは発明者が報告した ex vivo の肝臓における CO による類洞血流維持作用 (Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. J Clin Invest. 1995 Nov; 96(5): 2431-2437.) と矛盾しない結果であり、赤血球を、CO を末梢組織に運ぶ担体として使用できることが初めて明らかにされたことになる。

一方、全身のアシドーシスに対する改善効果を検討する目的で、動脈血の Hb 及び重炭酸濃度 pH により Base excess を算出した。Base excess は通常、プラス 2.5 以上がアルカローシス、マイナス 2.5 以下がアシドーシスを意味する。Base excess は、3 製剤とも有意な改善効果が認められ、 α NOhRBC が最も強力な改

善効果を発揮し、COhRBC, hRBC に比べても有意な改善効果が確認された (#P<0.05)。

これらの改善効果に加えて、肝臓全体の viability の指標である胆汁分泌改善効果では、 α NOhRBC、hRBC、COhRBC の順に改善効果が増強し、特に α NOhRBC
5 ではショック前に比べても有意な胆汁分泌増強効果が認められた。ATP は毛細胆管の律動的収縮運動の活性化を起こすことが in vitro で示されているが (Kitamura T, Brauneis U, Gatmaitan Z, Arias IM. Extracellular ATP, intracellular calcium and canaliculi contraction in rat hepatocyte doublets. Hepatology. 1991 Oct; 14(4 Pt 1): 640-647.)、ATP 分泌能の高い α NOhRBC が
10 胆汁分泌活性化作用を示したことはこの事実と矛盾しない。いずれにせよ、CO-hRBC の投与は肝臓類洞血流の改善法として有用であり、 α NOhRBC の投与は肝臓の類洞血流回復に加えて全身の酸塩基平衡障害 (例えばアシドーシス) の是正に有力な方法であることが示された。

15 実施例 4

本実施例では、赤血球(RBC)を含む浮遊液において、細胞外液 (赤血球の外) に含まれるアデノシンが、赤血球からの ATP 放出に対し、どのように影響するかを検討した。方法は、実施例 1 に準じて以下の通り行った。

赤血球の外液にアデノシンを 5 分間添加した後、酸素分圧を 0~150 mmHg の
20 範囲で所望の値に調整した Krebs buffer を含む密封キュベットに赤血球浮遊液を注入し、1 分後に反応を停止した。

その結果、細胞外液に 1 μ mol/L のアデノシン(Adenosine)を添加すると、正常酸素濃度での ATP 放出、および 1 分間の低酸素による ATP 放出も 2 倍近く増強した (図 4)。

25 次に、低酸素による ATP 放出に対するアデノシンの濃度依存的な効果を検討した。

結果を図 5 に示す。図 5 中、「Anoxia」は酸素分圧 0 mmHg (無酸素状態、1 分処理) で調整し、「Normoxia」は 100 mmHg (肺胞及び血中での通常の酸素

分圧、1分処理)で調整した Krebs buffer を用いて測定したときの結果を示す。Anoxia では、 $1 \mu\text{mol/L}$ (10^{-6}mol/L) のアデノシンを添加するだけで、放出される ATP の量が約 2 倍になることが示された (図 5 ●)。

図 5 の結果より、ATP の原料となるアデノシンを添加することで ATP 量の増加が引き起こされたと考えられる。そして、このことは、低温保存した血液 (輸血血液等) にアデノシンを添加しておくことで ATP 遊離能の高い血液の保存を実現することができ、新たな血液保存方法の開発に応用できることを示すものである。

実施例 5

10 本実施例は、ATP の遊離に関係する膜タンパク質を検討することを目的とする。方法は、実施例 1 に準じて行った。

まず、一酸化炭素処理赤血球(CO(+))では、低酸素における ATP の遊離増加は確認できず、 $1 \mu\text{mol/L}$ のアデノシンを添加下においても、低酸素による ATP の遊離増加はごくわずかであった (図 6 「Adenosine(+)」、●)。つまり、Hb を
15 CO で処理して R-状態にすると、ATP の遊離増加促進効果は消失又は低下することが示された。図 6 の○は、対照 (Control) である。

次に、ATP が赤血球膜上のどこから細胞外に出てくるのかを検討した。赤血球の膜には、膜タンパク質である Band III (Anion Exchanger-1) が存在することが知られている。この Band III の細胞外ドメインに細胞外から結合し、このチャネルタンパク質の穴を塞ぐ薬物として、糖尿病の治療に用いられる DIDS (4,4'-diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonic acid) と呼ばれるスルフォニルウレアがある。この DIDS を用いて、ATP が赤血球膜の Band III を介して遊離するか否かを検討した。まず、ATP 遊離増加促進作用を CO 処理により消失させた
25 条件下で、上記の検討を行った。

その結果、アデノシン存在/非存在下において、CO(+)赤血球に DIDS を添加しても、DIDS 無添加の場合と ATP 遊離量に差はなかった (図 7)。これにより、DIDS が R-状態の赤血球からの ATP 遊離促進に作用しているという可能性を排

除できた。

次に、CO 未処理の赤血球を用いて、DIDS の濃度依存的な効果を検討した。

結果を図 8 に示す。図 8 中、「Anoxia」は酸素分圧 0 mmHg で調整し、
「Normoxia」は通常の酸素分圧で調整した Krebs buffer を用いて測定したとき
5 を示す。その結果、DIDS の濃度依存的に、低酸素による ATP の遊離増加は抑制
されることが示された（図 8）。

また、 10^{-4} mol/L の DIDS による ATP 遊離増加抑制作用を 0~140 mmHg の
酸素分圧において検討した。その結果、DIDS は低酸素による ATP 遊離増加を抑
制することが示された（図 9）。

10 従って、無酸素又は低酸素雰囲気下により遊離が増加した ATP は、赤血球膜
に存在する Anion exchanger である Band III を介して細胞外に遊離しているこ
とが示された。

そして、この DIDS を細胞外液に添加することで、赤血球からの ATP 遊離量
を任意に制御できることも示された。

15

実施例 6

二酸化炭素には、「hypercapnic protection」と呼ばれる作用、つまり機械呼
吸で換気を人為的に少なくして二酸化炭素濃度を上昇させると ARDS（成人呼吸
促迫症候群、Adult respiratory distress syndrome）の予後を改善する作用があ
20 ることが知られている。そこで、本実施例では、二酸化炭素の hypercapnic 作用
を ATP 遊離の点から検討した。

方法は、実施例 1 の方法に準じて行い、二酸化炭素分圧 (P_{CO_2}) を 0~80 mmHg
まで変化させて 5 分間処置したときの ATP 放出量を測定した。

結果を図 10 に示す。Anoxia（無酸素状態）では ATP の遊離は P_{CO_2} に影響さ
25 れなかった。これに対し、正常酸素状態（Normoxia）では、ATP の遊離は、60
~80 mmHg で上昇し、80 mmHg では、アデノシン処置の有無に関係なくいず
れの場合も有意に差があり、アデノシンを添加したときは、ATP の遊離は相乗的
な高い効果を示した。従って、本実施例により、通常の酸素分圧下における赤血

球の外液に含まれる二酸化炭素分圧を高くすると、ATP の放出能が上昇することが示された。

産業上の利用の可能性

5 発明の効果

本発明により、赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態に安定化させる物質を含む、赤血球からの ATP 遊離促進剤、及び赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態に安定化させる物質を含む、赤血球からの ATP 遊離抑制剤が提供される。

10 ヘモグロビンの構造を T-状態に安定化させると、高酸素分圧状態でも赤血球から ATP を遊離させることができる。一方、ヘモグロビンの構造を R-状態に安定化させると、低酸素分圧状態でも赤血球からの ATP 放出を抑制することができる。従って、本発明の ATP 遊離促進剤は血管拡張薬又は血流改善薬として、また、本発明の ATP 遊離抑制剤は血管収縮薬、血流制御薬、血管拡張阻害薬又は血管過拡張を伴う敗血症ショックの治療薬として有用である。

15 さらに、ヘモグロビンの構造が T-状態に安定化された赤血球は、ATP を遊離して血管を拡張することができるため、血流を増加させることが可能である。一方、ヘモグロビンの構造が R-状態に安定化された赤血球は、敗血症ショックなどで末梢血管が過拡張をおこした病態で投与できる赤血球製剤として有用であり、また、ATP の遊離を抑制して血小板の活性化を抑制するため、血栓を防止するこ
20 とが可能である。

請求の範囲

1. 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質を含む、赤血球からの ATP 遊離促進剤。
- 5 2. 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質が、ベザフィブラート、一酸化窒素、二酸化炭素及びアデノシンからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 1 記載の促進剤。
3. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において細胞外に ATP を遊離させることができる請求項 1 又は 2 記載の促進剤。
- 10 4. 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。
5. 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態で安定化させる物質が、ベザフィブラート、一酸化窒素、二酸化炭素及びアデノシンからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 4 記載の医薬組成物。
- 15 6. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において ATP を細胞外に遊離させることができる請求項 4 又は 5 記載の医薬組成物。
7. 血管拡張薬又は血流改善薬である請求項 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
8. 赤血球中のヘモグロビンの構造を T-状態に安定化することを特徴とする、赤血球から ATP を遊離させる方法。
- 20 9. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において ATP を遊離させることを特徴とする請求項 8 記載の方法。
10. 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質を含む、赤血球からの ATP 遊離抑制剤。
- 25 11. 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質が、一酸化炭素又はスルフォニルウレアである請求項 10 記載の抑制剤。
12. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において ATP の遊離を抑制することができる請求項 10 又は 11 記載の抑制剤。

- 1 3. 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質を含む、医薬組成物。
- 1 4. 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態で安定化させる物質が、一酸化炭素又はスルフォニルウレアである請求項 1 3 記載の医薬組成物。
- 5 1 5. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において ATP の遊離を抑制することができる請求項 1 3 又は 1 4 記載の医薬組成物。
- 1 6. 血管収縮薬又は血流制御薬である請求項 1 3 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
- 1 7. 赤血球中のヘモグロビンの構造を R-状態に安定化することを特徴とする、
10 赤血球からの ATP の遊離を抑制する方法。
- 1 8. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において ATP の遊離を抑制することを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。
- 1 9. ヘモグロビンの構造が T-状態で安定化された赤血球。
- 2 0. ベザフィブラート、一酸化窒素、二酸化炭素、アデノシン及び水素イオン
15 からなる群から選択される少なくとも 1 つの物質で処理された請求項 1 9 記載の赤血球。
- 2 1. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において ATP を遊離することができる請求項 1 9 又は 2 0 記載の赤血球。
- 2 2. ヘモグロビンの構造が R-状態で安定化された赤血球。
- 20 2 3. 一酸化炭素又はスルフォニルウレアで処理された請求項 2 2 記載の赤血球。
- 2 4. 100 mmHg 以下の酸素分圧下において ATP の遊離を抑制することができる請求項 2 2 又は 2 3 記載の赤血球。
- 2 5. 請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の赤血球を含む医薬組成物。
- 2 6. 虚血性疾患を治療するための請求項 2 5 記載の医薬組成物。
- 25 2 7. 虚血性疾患が、出血性ショック、心筋梗塞、狭心症、脳梗塞、脳出血、閉塞性動脈疾患、糖尿病による血管障害、冠動脈狭窄症、四肢虚血性疾患、閉塞性動脈硬化症及び虚血性潰瘍・壊死からなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 2 6 記載の医薬組成物。

28. 虚血性疾患が、虚血・再灌流症候群である請求項26記載の医薬組成物。
29. 虚血・再灌流症候群が、ショック後蘇生、臓器冷保存後灌流、外科手術後血流再開通、及び閉塞血管の再建からなる群から選択される、少なくとも一つの原因により起こるものである請求項28記載の医薬組成物。
- 5 30. アシドーシスを治療するための請求項25記載の医薬組成物。
31. 請求項22～24のいずれか1項に記載の赤血球を含む医薬組成物。
32. 血管拡張性疾患を治療するための請求項31記載の医薬組成物。
33. 血管拡張性疾患が、敗血症ショック又はアナフィラキシーショックである請求項32記載の医薬組成物。
- 10 34. 赤血球から遊離された ATP 量を酸素濃度依存性に定量することを特徴とする ATP の測定方法。
35. 赤血球浮遊液にアデノシンを添加し、得られる浮遊液を無酸素又は低酸素分圧条件下に曝すことを特徴とする、赤血球からの ATP の遊離を増強させる方法。
- 15 36. 無酸素又は低酸素分圧条件が 0 mmHg～150 mmHg の条件である請求項35記載の方法。
37. 赤血球浮遊液にアデノシンを添加し、得られる浮遊液を 60 mmHg～80 mmHg の二酸化炭素分圧条件下に曝すことを特徴とする、赤血球からの ATP の遊離を増強させる方法。
- 20 38. アデノシンの濃度が $0.1 \mu\text{mol/L}$ ～ $10 \mu\text{mol/L}$ である請求項35～37のいずれか1項に記載の方法。
39. アデノシンが添加された赤血球浮遊液に、バンド3タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質を添加することを特徴とする、赤血球からの ATP の遊離を制御する方法。
- 25 40. バンド3タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質がスルフォニルウレアである請求項39記載の方法。
41. バンド3タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質を含む、赤血球からの ATP 遊離制御剤。

- 4 2. バンド 3 タンパク質の陰イオン透過機能阻害物質がスルフォニルウレアである請求項 4 1 記載の制御剤。
- 4 3. ATP の遊離を抑制するための請求項 4 1 又は 4 2 記載の制御剤。